

## ■ Adecuación de la dosis mínima efectiva del fungicida Fluazinam para su uso combinado con *Trichoderma atroviride* en el control de la podredumbre blanca del aguacate

D. Ruano-Rosa, C. J. López-Herrera

Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Córdoba (SPAIN)

### RESUMEN

Estudios anteriores de nuestro equipo revelaron la posibilidad del uso combinado del fungicida de contacto Fluazinam y el agente de control biológico *Trichoderma* dada la compatibilidad entre ambos y su efectividad *in vitro* frente a *Rosellinia necatrix*, agente causal de la Podredumbre blanca del aguacate. Sin embargo, la dosis mínima de Fluazinam (0,01 %) ensayada in planta de forma individual, presentó la misma eficacia que su combinación con *Trichoderma* spp., sugiriendo así la posibilidad de reducir aún más dicha concentración.

En el presente trabajo la dosis del fungicida se redujo a 0,001 % y se combinó con *Trichoderma atroviride*, frente a cuatro aislados de *R. necatrix* representantes de diferentes grupos de virulencia e inoculados en plantas de aguacate del cv. Topa-Topa.

Los tratamientos combinados fueron efectivos en los cuatro aislados del patógeno diferenciándose significativamente de los controles inoculados. Adicionalmente, en dos de ellos (Rn 50 y Rn 320) no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos combinados y los individuales, con *Trichoderma* o con Fluazinam, respectivamente. Esto sugiere la posibilidad de un uso exclusivo del antagonista para el aislado Rn 50 y la disminución por debajo del 0,001% de la dosis del fungicida en la combinación con el antagonista, para el aislado Rn 320.

En general los resultados obtenidos in planta ponen de manifiesto la efectividad del control combinado de *Trichoderma* con dosis mínima (0,001%) de Fluazinam, ya que retrasó la aparición de los primeros síntomas de marchitez y redujo significativamente el área bajo la curva de progreso epidémico de la enfermedad.

Palabras clave: Agente de control biológico, control integrado, fungicida de contacto, *Persea americana*, *Rosellinia necatrix*.

### INTRODUCCIÓN

El aguacate o palta (*Persea americana* Prill.) es un cultivo ampliamente extendido en el litoral andaluz, Sur de España, desde 1970. Una superficie en plantación regular de más de 9.400 hectáreas, con una producción total de 59.066 toneladas en el año 2013 (Anónimo, 2014) hacen de este cultivo un pilar importante de la economía local.

La Podredumbre blanca de raíz (PBR) del aguacate, causada por el hongo de suelo *Rosellinia necatrix* Prill. (anamorfo: *Dematophora necatrix* Hartig), es en la actualidad uno de los principales problemas bióticos que afectan a este cultivo en España, dónde desde su detección (López-Herrera, 1989) ha aumentado su incidencia progresivamente (López-Herrera, 1998). Este patógeno, que causa marchitez y la muerte del árbol pocas semanas después de la aparición de los primeros síntomas, ha sido detectado en numerosos lugares por todo el mundo (Israel, Mexico, etc.), afectando a más de 170 especies pertenecientes a 63 géneros distintos (Ten Hoopen & Krauss, 2006).

Dada la dificultad que implica el control de este patógeno, son múltiples las estrategias de manejo que se han propuesto, las cuales incluyen, prácticas culturales (Guillaumin, 1986), métodos físicos como la solarización (López-Herrera *et al.*, 1998; 1999), tratamientos químicos (Gupta, 1977; López-Herrera & Zea-Bonilla, 2007), uso de agentes de control biológico (ACB) y/o el empleo de patrones tolerantes a la PBR (Barceló-Muñoz *et al.*, 2007). Entre los métodos de control biológico destacan aquellos que emplean especies del género *Trichoderma* como principal protagonista, donde el aislado CH 304.1 de *Trichoderma atroviride* ha mostrado elevada capacidad de inhibición *in vitro* del patógeno y de la PBR del aguacate in planta (Ruano-Rosa & López-Herrera, 2009; Ruano-Rosa *et al.*, 2010a). Sin embargo, también se han propuesto el uso de otros microorganismos como rizobacterias (Pliego *et al.*, 2011), micorrizas (Ruano-Rosa *et al.*, 2011) o más recientemente combinaciones de diferentes microorganismos (Ruano-Rosa *et al.*, 2014). En la actualidad, diversos grupos de investigación abordan el control de este patógeno mediante el uso de virus que confieran a este hongo reducción o pérdida de su capacidad patogénica (Yaegashi *et al.*, 2011) o el uso de metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp. (Arjona-Girona *et al.* 2014).

Desde que se realizaran los primeros estudios de fungicidas frente a *R. necatrix* en el año 1915 (Fawcett, 1915), son múltiples las alternativas que han ido surgiendo como el Dazonet (Nitta *et al.*, 2002) o algunos benzimidazoles (Behdad, 1976) entre otros. De todos destaca recientemente el fungicida de contacto Fluazinam, el cual tiene efecto protector y centra su acción en las mitocondrias, donde desacopla la fosforilación oxidativa mediante la ionización de grupos amino (Roberts & Hutson 1999). Este ha mostrado capacidad preventiva en invernadero frente a otros patógenos de los géneros *Phytophthora*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Pseudoperonospora*, *Pyricularia*, *Sclerotinia* o *Venturia* (Komyoji *et al.*, 1995). Trabajos previos de nuestro grupo han puesto de manifiesto la actividad fungistática, *in vitro* e in planta, del Fluazinam frente a *R. necatrix* y a la PBR en el aguacate a la concentración de 0,1% (p/v). Esta actividad junto con su gran persistencia en suelo lo convierte en una buena alternativa de control de esta enfermedad (López-Herrera & Zea-Bonilla 2007).

Sin embargo, en los últimos años hemos asistido a un aumento del interés, por parte de consumidores, comerciantes y productores, en productos libres de biocidas de base química. Esto ha dado lugar a que la comunidad científica centre sus esfuerzos en su reducción y/o eliminación. Para hacer frente a esta demanda se ha optado recientemente a la implementación de estrategias de control integrado que combinen herramientas de tipo cultural, físico, químico y/o biológico.

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la posibilidad de un control integrado de la enfermedad mediante el uso combinado del fungicida de contacto Fluzinam con el ACB T. atroviride CH 304.1. Esto nos permitiría actuar frente a la PBR del aguacate reduciendo al mismo tiempo la concentración de fungicida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material fúngico, químico y vegetal

Para el presente estudio se utilizaron 4 aislados de *R. necatrix* procedentes de raíces de árboles de aguacate (Tabla 1) pertenecientes a diferentes grupos de virulencia: Rn 320 (Alta), Rn 400 (Media/Alta), Rn 50 (Media) y Rn 30 (Baja).

**Tabla 1. Aislados utilizados en este trabajo**

Aislado	Especie	Año
CH 304.1	<i>Trichoderma atroviride</i>	2001 (Ruano-Rosa & López-Herrera, 2009)
Rn 30	<i>Rosellinia necatrix</i>	1990 (Ruano-Rosa <i>et al.</i> , 2010a)
Rn 50	<i>R. necatrix</i>	1991 (Ruano-Rosa <i>et al.</i> , 2010a)
Rn 320	<i>R. necatrix</i>	2001 (López-Herrera & Zea-Bonilla, 2007)
Rn 400	<i>R. necatrix</i>	1991 (López-Herrera & Zea-Bonilla, 2007)

x Referencia bibliográfica

Como ACB se utilizó el aislado CH 304.1 de *T. atroviride* (Ruano-Rosa & López-Herrera 2009; Ruano-Rosa *et al.*, 2010a; Ruano-Rosa & López-Herrera 2011). Dicho fungicida fue proporcionado por la empresa ISK Biosciencias Europe S.A., y aplicado a una concentración de 0,001%.

El material vegetal empleado consistió en plantas de aguacate de 6 meses de edad del cv. Topa-Topa, procedentes de germinación directa de semilla, crecidas en macetas de 4 L con sustrato Laura (turba:fibra de coco:perlita; 6:1:0,6; v/v/v) complementado con 1,3 mL de Osmocote® Plus Mini (16 + 8 + 11 + 2MgO + TE, longevidad 3-4 meses) por L de sustrato.

Los inóculos fúngicos empleados consistieron en semillas de trigo hidratadas, esterilizadas y colonizadas con cada uno de los aislados independientemente (Sztejnberg & Madar 1980).

Evaluación in planta de la combinación del aislado CH 304.1 de *Trichoderma atroviride* y el fungicida Fluzinam a 0,001% frente a la Podredumbre blanca radicular del aguacate.

La inoculación con el antagonista se realizó a razón de 109 conidias L-1 de sustrato, mientras que los diferentes aislados del patógeno se hicieron a razón de 3,75 g de trigo colonizado L-1 de sustrato. Los tiempos de inoculación para CH 304.1, Fluzinam 0,001% y *R. necatrix* fueron a los 0, 7 y 15 días respectivamente desde el comienzo del experimento. Se efectuó una sola aplicación del antagonista, fungicida o patógeno.

El análisis de síntomas se efectuó cada 3 días utilizando una escala de 1-5: 1, planta sana; 2, planta con primeros síntomas de marchitez; 3, planta totalmente marchita; 4, planta marchita con los primeros síntomas de desecación foliar y 5, planta muerta. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular el área bajo la curva de progreso epidémico estandarizado (ABCPEE; Campbell & Madden 1990). El experimento siguió un diseño experimental factorial con *R. necatrix* y el tratamiento (Fluzinam + CH 304.1) como variables e incluyendo la interacción entre dichas variables. Un ANOVA se aplicó a la media de los datos de seis repeticiones y se compararon utilizando el test de Diferencia Mínima Significativa protegido de Fisher (Fernández-Escobar *et al.*, 2010). El experimento se repitió una vez en similares condiciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La dosis mínima efectiva (0,1%) de Fluzinam fue determinada en trabajos previos por López-Herrera & Zea-Bonilla (2007) para el control de la PBR en plantas de aguacate inoculadas artificialmente con el patógeno. Esta misma dosis ha sido también ensayada con éxito por otros grupos de investigación frente a otros patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* (Trazilbo *et al.*, 2009). Posteriormente se estudió el efecto combinado de un ACB con probada actividad de control de la PBR (Ruano-Rosa & López-Herrera 2009; Ruano-Rosa *et al.*, 2010) y este fungicida a una dosis inferior de 0,01%. Los resultados de este estudio revelaron que dicha dosis era efectiva por sí sola en el control de la enfermedad, lo que hacía considerar la posibilidad de reducir aún más la dosis de Fluzinam (Ruano-Rosa *et al.*, 2010b; Ruano-Rosa & López-Herrera 2011). Por tanto en el presente trabajo, la dosis del fungicida Fluzinam utilizada fue 0,001%, dos órdenes de magnitud inferior a la determinada previamente por López-Herrera & Zea-Bonilla (2007).

Puesto que los resultados obtenidos en ambos experimentos no se diferenciaron significativamente, se realizó un análisis conjunto ANOVA con 12 repeticiones por tratamiento efectuado (seis por cada experimento). Las medias se compararon siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos. La aplicación del fungicida a dosis de 0,001% redujo significativamente el ABCPEE respecto a las plantas control inoculadas solo con el patógeno, pero no se obtuvo una inhibición total de la enfermedad en comparación con los resultados obtenidos en estudios previos en los que la dosis aplicada fue de 0,01% (Ruano-Rosa & López-Herrera 2011). Los valores obtenidos de ABCPEE para las plantas inoculadas con Patógeno-ACB-fungicida se diferenciaron significativamente de las plantas control inoculadas solo con el patógeno en los cuatro aislados de *R. necatrix* estudiados. La combinación ACB-Fluazinam con los patógenos Rn 30, Rn 50 y Rn 400 vieron además mejorado el control de la enfermedad comparado con la aplicación del fungicida solo a 0,001%. Este tipo estrategia de control ha sido descrito por otros autores los cuales han obtenido buenos resultados frente a otros patosistemas como *Rhizoctonia solani*-Arroz (Boukaew *et al.*, 2013) o *Phytophthora ultimum*-Tomate (Salman & Abuamsha 2012). No hubo diferencias significativas entre el tratamiento combinado fungicida-antagonista y el individual con *Trichoderma* en plantas inoculadas con Rn 50, lo que sugiere que podría realizarse el uso exclusivo del antagonista en algunos casos para el control de la enfermedad. Por otro lado al no observarse diferencias significativas entre la aplicación combinada fungicida-antagonista con respecto a la aplicación sólo del fungicida en plantas inoculadas con Rn 320, se sugiere para otros casos la disminución de la dosis del fungicida en la combinación con el antagonista (Figura1)

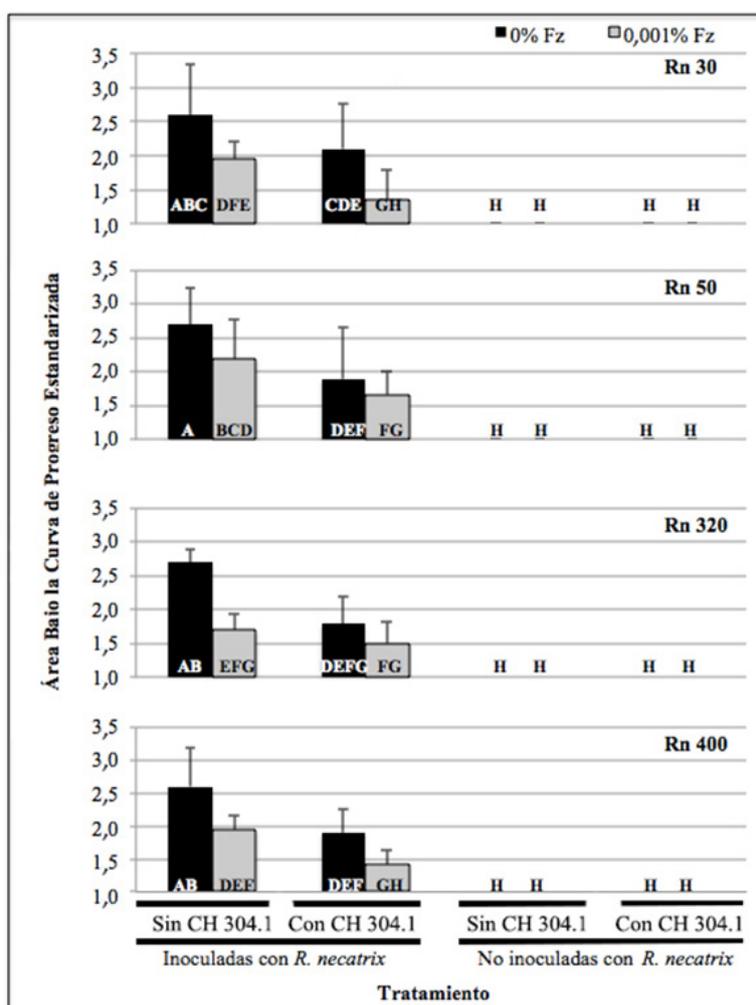


Figura 1. Evaluación in vivo del tratamiento combinado del aislado CH 304.1 de *Trichoderma atroviride* y el fungicida de contacto fluazinam 0,001% para controlar la Podredumbre blanca radicular del aguacate

Los valores muestran el área bajo la curva de progreso epidémico estandarizado ( $\pm$ SE). Columnas con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ) de acuerdo con el test de Diferencia Mínima Significativa protegido de Fisher.

Este tipo de estrategias, que combinan bajas dosis de un fungicida con uno o varios ACB sirven para manejar la aparición de resistencia, ampliar el espectro de acción e incluso reducir las cantidades a aplicar no solo del agente químico sino también del biológico (Janisiewicz & Conway 2010). Un aspecto a destacar fue el referente a la aparición de los primeros síntomas, los cuales se vieron retrasados en los tratamientos que combinaban fungicida-antagonista respecto a las plantas inoculadas sólo con el patógeno, llegando en algunos casos a ser superior a los 10 días.

Adicionalmente se corroboró la capacidad de control que el aislado CH 304.1 ejerce sobre la PBR del aguacate observada en estudios previos por Ruano-Rosa & López-Herrera (2009).

## CONCLUSIONES

En conclusión, se ha conseguido el retraso en la aparición de síntomas y el control efectivo de la PBR del aguacate mediante el uso combinado del fungicida Fluazinam, a una dosis de 0,001%, con un aislado de *T. atroviride* (CH 304.1). Estos resultados proporcionarán en el futuro un control de la enfermedad más efectivo y seguro, tanto para salud humana como para el medioambiente.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (AGL 2008-05453-C02-02/AGR), CICE Junta de Andalucía (Grupo PAIDI, AGR-235) y co-financiado con fondos FEDER de la Unión Europea. Los autores quieren agradecer también la aportación del fungicida Fluazinam por la empresa ISK Biosciencias Europe S.A.

## LITERATURA CITADA

- Anónimo. 2014. Avance Anuario de Estadística, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, España.
- Arjona-Girona, M I, Vinale, F, Ruano-Rosa, D, Lorito, M & López-Herrera, C J. 2014. Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot, *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 140, pp. 385-397.
- Barceló-Muñoz, A, Zea-Bonilla, T, Jurado-Valle, I, Imbroada-Solano I, Vidoy-Mercado, I, Pliego-Alfaro, F & López-Herrera, C J. 2007. Programa de selección de portainjertos de aguacate tolerantes a la podredumbre blanca causada por *Rosellinia necatrix* en el sur de España (1995-2007). In: VI Congreso Mundial de Aguacate, pp. 12-16.
- Behdad, E. 1976. The influence of several new systemic fungicides on *Rosellinia necatrix* (Hartig) Berlese, *Iranian Journal of Plant Pathology*, Vol. 12, pp. 40-41.
- Boukaew, S, Klinmanee, C & Prasertsan, P. 2013. Potential for the integration of biological and chemical control of sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* on rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 29, pp. 1885-1893
- Campbell, C L & Madden L V. 1990. Temporal analysis of epidemics. I: descriptions and comparisons of disease progress curve. En: *Introduction to Plant Disease Epidemiology*, pp. 161-202. Eds C. L. Campbell & L. V. Madden. New York: Wiley.
- Fawcett, G L. 1915. Fungus diseases of coffee in Porto Rico. *Porto Rico Agricultural Experimental Station, Bulletin* 17.
- Fernández-Escobar, R, Trapero-Casas, A & Domínguez Jiménez, J. 2010. Experimentación en Agricultura: Junta de Andalucía.
- Guillaumin, J J. 1986. Le pourridié, *Phytoma*, Vol. 19, pp. 20-23.
- Gupta, V K. 1977. Possible use of Carbendazim in the control of *Dematophora* root rot of apple, *Indian Phytopathology*, Vol. 30, pp. 527-531.
- Janisiewicz, W & Conway W S. 2010. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest, *Stewart Postharvest Review*, Vol 6, pp. 1-16.
- Komyoji, T, Sugimoto, K, Mitani, S, Matsuo, N & Suzuki, K. 1995. Biological properties of a new fungicide, fluazinam, *Journal of Pesticide Science*, Vol. 20, pp. 129-135.
- López-Herrera, C J. 1989. Podredumbres radiculares del aguacate en la Costa del Sol. Años 1987-88. En: *Estudios de Fitopatología SEF/DGIEA*, pp. 172-176. Ed d. M. J. Badajoz, España.
- López-Herrera, C J. 1998. Hongos de suelo en el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) del litoral andaluz. En: *V Jornadas andaluzas de frutos tropicales. Congresos y Jornadas 47/98*, pp. 137-152. Ed C. d. A. y Pesca. Sevilla, España.
- López-Herrera, C J, Pérez Jiménez, R M, Basallote Ureba, M J, Zea Bonilla, T & Melero Vara, J M. 1999. Loss of viability of *Dematophora necatrix* in solarized soils, *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 105, pp. 571-576.
- López-Herrera, C J, Pérez Jiménez, R M, Zea Bonilla, T, Basallote Ureba, M J & Melero Vara, J M. 1998. Soil solarization in established avocado trees for *Dematophora necatrix*, *Plant Pathology*, Vol. 82, pp. 1088-1092.
- López-Herrera, C J & Zea-Bonilla, T. 2007. Effects of benomyl, carbendazim, fluazinam and thiophanate methyl on white root rot of avocado, *Crop Protection*, Vol. 26, pp. 1186-1192.

- Nitta, H, Hatamoto, M & Kurihisa, H. 2002. Control of white root rot on Japanese pear using dazomet micro-granules, Bulletin of Hiroshima Prefectural Agriculture Research Center, Vol. 72, pp. 25-34.
- Roberts, T & Hutson, D. 1999. Metabolic Pathways of Agrichemicals. En: Part two: Insecticides and Fungicides, pp. 1420-1423. Eds T. Robert & D. Hutson. Great Britain: Royal Society of Chemistry.
- Ruano-Rosa, D, Cazorla, F M, Bonilla, N, Martín-Pérez, R, De Vicente, A & López-Herrera, C J. 2014. Biological control of avocado white root rot with combined applications of *Trichoderma* spp. and rhizobacteria, European Journal of Plant Pathology, Vol. 138, pp. 751-762.
- Ruano-Rosa, D, del Moral-Navarrete, L & López-Herrera, C J. 2010a. Selection of *Trichoderma* isoaltes antagonistic to *Rosellinia necatrix*, Spanish Journal of Agricultural Research, Vol. 8, pp. 1084-1097.
- Ruano-Rosa, D, Jordán-Ramírez, R, Barceló-Muñoz, A & López-Herrera, C J. 2011. Efecto de *Glomus intraradices* sobre el crecimiento de plantas de aguacate y el control de la Podredumbre blanca de raíces. VII Congreso Mundial del Aguacate, Cairns (Australia) p. 104.
- Ruano-Rosa, D & López-Herrera, C J. 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot, Biological Control, Vol. 51, pp. 66-71.
- Ruano-Rosa, D & López-Herrera, C J. 2011. Control de la Podredumbre blanca del aguacate mediante métodos químicos y biológicos combinados. VII Congreso Mundial del Aguacate, Cairns (Australia) p. 103.
- Ruano-Rosa, D, Osorio-Hernández, E, Hernández-Castillo, F D & López-Herrera, C J. 2010b. Control de la Podredumbre blanca del aguacate mediante el uso combinado de *Trichoderma* spp. y Fluazinam. XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Vitoria (España) p. 413
- Salman, M, Abuamsha, R. 2012. Potential for integrated biological and chemical control of damping-off disease caused by *Pythium ultimum* in tomato, BioControl, Vol. 57, pp. 711-718.
- Sztejnberg, A & Madar, Z. 1980. Host range of *Dematophora necatrix*, the cause of white root rot disease in fruit trees, Plant Disease, Vol. 64, pp. 662-664.
- Ten Hoopen, G M & Krauss, U. 2006. Biology and control of *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix* and *Rosellinia pepo*: A review, Crop Protection, Vol. 25, pp. 89-107.
- Trazilbo, J P J, Faria Veira, R, Ribero Rocha, P R, Bernades, A, Costa, E L, Souza Carneiro, J E, Ribeiro do Vale, F J & Zambolim L. 2009. White mold intensity on common bean in response to plant density, irrigation frequency, grass mulching, *Trichoderma* spp., and fungicide, Summa Phytopathologica, Vol. 35, pp. 44-48.
- Yaegashi, H, Nakamura, H, Sawahata, T, Sasaki, A, Iwanami, Y, Ito, T & Kanematsu S. 2011. Appearance of mycovirus-like double-stranded RNAs in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, in an apple orchard, FEMS: Microbiology Ecology, Vol. 83, pp. 49-62.



# ACTAS • PROCEEDINGS

## VIII CONGRESO MUNDIAL DE LA PALTA 2015

del 13 al 18 de Septiembre. Lima, Perú 2015

[www.wacperu2015.com](http://www.wacperu2015.com)

